WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANWELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE MENARBEIT AUF DEM GEBIET DES TENTWESENS (PCT) INTERNATIONALE ZU

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12N 15/82, 9/10, 15/54, A01H 5/00

hungsnummer: (11) Internationale Veröffer

WO 97/44472

A1 (43) Internationales Ver"ffentlichungsdatum:

27. November 1997 (27.11.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP97/02527

(22) Internationales Anmeldedatum:

16. Mai 1997 (16.05.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 19 918.2

17. Mai 1996 (17.05.96)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PLANT-TEC BIOTECHNOLOGIE GMBH [DE/DE]; Hermannswerder 14, D-14473 Potsdam (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOSSMANN, Jens [DE/DE]; Golmer Fichten 9, D-14476 Golm (DE). FROHBERG, Claus [DE/DE]; Blankenhainer Strasse 17, D-12249 Berlin (DE).

(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, HU, JP, KR, US, europäisches Patent (AT. BE, CH. DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULES CODING SOLUBLE MAIZE STARCH SYNTHASES

(54) Bezeichnung: NUCLEINSÄUREMOLEKÜLE CODIEREND LÖSLICHE STÄRKESYNTHASEN AUS MAIS

(57) Abstract

The description relates to nucleic acid molecules which code enzymes taking part in starch synthesis in plants. These enzymes involve a novel isoform of soluble maize starch synthases. The invention also relates to vectors containing such nucleic acid molecules and host cells which have been transformed with the nucleic acid molecules described, especially transformed plant cells and plants regeneratable from them exhibiting an increased or reduced activity of the proteins described.

(57) Zusammenfassung

Es werden Nucleinsäuremoleküle beschrieben, die Enzyme codieren, die an der Stärkesynthese in Pflanzen beteiligt sind. Bei diesen Enzymen handelt es sich um eine neue Isoform der löslichen Stärkesynthase aus Mais. Weiterhin betrifft diese Erfindung Vektoren, die derartige Nucleinsäuremoleküle enthalten, und Wirtszellen, die mit den beschriebenen Nucleinsäuremolekülen transformiert wurden, insbesondere transformierte Pflanzenzellen und aus diesen regenerierbare Pflanzen, die eine gesteigerte oder verringerte Aktivität der beschriebenen Proteine aufweisen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
ΑT	Osterreich	FR	Prankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland ·		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL.	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS ·	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ.	Kasachstan	.RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI:	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Nucleinsäuremoleküle codierend lösliche Stärkesynthasen aus Mais

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die eine Form der löslichen Stärkesynthase aus Mais codieren.
Weiterhin betrifft diese Erfindung Vektoren, Bakterien, sowie mit den beschriebenen Nucleinsäuremolekülen transformierte Pflanzenzellen und aus diesen regenerierbare Pflanzen.
Ferner werden Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen beschrieben, die aufgrund der Einführung von DNA-Molekülen, die eine lösliche Stärkesynthase aus Mais codieren, eine in ihren Eigenschaften veränderte Stärke synthetisieren.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen in letzter Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Neben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide die wesentlichen nachwachsenden Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speicherstoffe in höheren Pflanzen ist. Hierbei ist Mais eine der interessantesten Pflanzen, da sie die weltweit für die Stärkeproduktion wichtigste Kulturpflanze ist.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades und des Auftretens von Verzweigungen der Glucoseketten unterscheiden. Daher stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Man unterscheidet insbesondere die AmyloseStärke, ein i wesentlichen unverzweigt Polymer aus α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ihrerseits ein komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glucoseketten darstellt. Die Verzweigungen kommen dabei durch das Auftreten von zusätzlichen α -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande. In typischen für die Stärkeproduktion verwendeten Pflanzen, wie z.B. Mais oder Kartoffel, besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 25 % aus Amylose-Stärke und zu ca. 75 % aus Amylopektin-Stärke.

Um eine möglichst breite Anwendung von Stärke zu ermöglichen, erscheint es wünschenswert, Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die in der Lage sind, modifizierte Stärke zu synthetisieren, die sich für verschiedene Verwendungszwecke besonders eignet. Eine Möglichkeit, derartige Pflanzen bereitzustellen, besteht neben züchterischen Maßnahmen - in der gezielten genetischen Veränderung des Stärkemetabolismus stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnologische Methoden. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Identifizierung und Charakterisierung der an der Stärkesynthese und/oder -modifikation beteiligten Enzyme sowie die Isolierung der entsprechenden, diese Enzyme codierende DNA-Moleküle.

Die biochemischen Synthesewege, die zum Aufbau von Stärke führen, sind im wesentlichen bekannt. Die Stärkesynthese in pflanzlichen Zellen findet in den Plastiden statt. In photosynthetisch aktiven Geweben sind dies die Chloroplasten, in photosynthetisch inaktiven, stärkespeichernden Geweben die Amyloplasten.

Die wichtigsten an der Stärkesynthese beteiligten Enzyme sind die Stärkesynthasen sowie die Verzweigungsenzyme. Bei den Stärkesynthasen sind verschiedene Isoformen beschrieben, die alle eine Polymerisierungsreaktion durch Übertragung eines Glucosylrestes von ADP-Glucose auf α -1,4-Glucane katalysieren. Verzweigungsenzyme katalysieren die Einführung von α -1,6-Verzweigungen in lineare α -1,4-Glucane.

Stärkesynthasen können in zwei Klassen eingeteilt werden: die Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthasen ("granule-bound starch synthases"; GBSS) und die löslichen Stärkesynthasen ("soluble starch synthases"; SSS). Diese Unterscheidung ist nicht in jedem Fall eindeutig zu treffen, da einige der Stärkesynthasen

sowohl stärkekorn unden als auch in löslicher Form vorliegen (Denyer et al., Plant J. 4 (1993), 191-198; Det al., Plant J. 6 (1994), 151-159). Für verschiedene Pflanzenspezies werden innerhalb dieser Klassen wiederum verschiedene Isoformen beschrieben, die sich hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von Startermolekülen unterscheiden (sogenannte "primer dependent" (Typ II) und "primer independent" (Typ I) starch synthases).

Lediglich für die Isoform GBSS I gelang es bisher, die genaue Funktion bei der Stärkesynthese zu ermitteln. Pflanzen, in denen diese Enzymaktivität stark oder vollkommen reduziert ist, synthetisieren eine amylosefreie (sogenannte "waxy") Stärke (Shure et al., Cell 35 (1983), 225-233; Visser et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 289-296; WO 92/11376), so daß diesem Enzym eine entscheidende Rolle bei der Synthese der Amylose-Stärke zugesprochen wird. Dieses Phänomen wird ebenfalls in reinhardtii beobachtet Grünalge Chlamydomonas Zellen der (Delrue et al., J. Bacteriol. 174 (1992), 3612-3620). Bei Chlamydomonas konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß GBSS I nicht nur an der Synthese der Amylose beteiligt ist, sondern auch einen Einfluß auf die Amylopektinsynthese besitzt. In Mutanten, die keine GBSS I-Aktivität aufweisen, fehlt eine bestimmte Fraktion des normalerweise synthetisierten Amylopektins, die längerkettige Glucane aufweist.

Die Funktionen der anderen Isoformen der Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthasen, insbesondere der GBSS II, und der löslichen Stärkesynthasen sind bisher unklar. Es wird angenommen, daß die löslichen Stärkesynthasen zusammen mit Verzweigungsenzymen an der Synthese des Amylopektins beteiligt sind (siehe z.B. Ponstein et al., Plant Physiol. 92 (1990), 234-241) und daß sie eine wichtige Funktion bei der Regulation der Stärkesyntheserate spielen.

Bei Mais wurden zwei Isoformen der Stärkekorn-gebundenen, sowie zwei bzw. drei Isoformen der löslichen Stärkesynthasen identifiziert (Hawker et al., Arch. Biochem. Biophys. 160 (1974), 530-551; Pollock und Preiss, Arch. Biochem. Biophys. 204 (1980), 578-588; MacDonald und Preiss, Plant Physiol. 78 (1985), 849-852; Mu et al., Plant J. 6 (1994), 151-159).

Eine GBSS I aus Mais codierende cDNA sowie eine genomische DNA sind bereits beschrieben (Shure et al., Cell 35 (1983), 225-

233; Kloesger t al., Mol. Gen. Genet. 3 (1986), 237-244). Weiterhin ist ein sogenannter "Expressed Sequence Tag" (EST) beschrieben worden (Shen et al., 1994, GenBank Nr.: T14684), dessen abgeleitete Aminosäuresequenz eine starke Ähnlichkeit zur abgeleiteten Aminosäuresequenz der GBSS II aus Erbse (Dry et al., Plant J. 2 (1992), 193-202) und Kartoffel (Edwards et al., Plant J. 8 (1995), 283-294) aufweist. Nucleinsäuresequenzen, die weitere Stärkesynthase-Isoformen aus Mais codieren, lagen jedoch bisher noch nicht vor. cDNA-Sequenzen, die für andere Stärkesynthasen als für die GBSS I codieren, wurden bisher lediglich für Erbse (Dry et al., Plant J. 2 (1992), 193-202), Reis (Baba et al., Plant Physiol. 103 (1993), 565-573) und Kartoffel (Edwards et al., Plant J. 8 (1995), 283-294) beschrieben.

Außer beim Mais wurden lösliche Stärkesynthasen auch in einer Reihe weiterer Pflanzenarten identifiziert. Lösliche Stärkesynthasen sind beispielsweise bis zur Homogenität aus Erbse (Denyer und Smith, Planta 186 (1992), 609-617) und Kartoffel (Edwards et al., Plant J. 8 (1995), 283-294) isoliert worden. In diesen Fällen stellte sich heraus, daß die als SSS II identifizierte Isoform der löslichen Stärkesynthase identisch ist mit der Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthase GBSS II (Denyer et al., Plant J. 4 (1993), 191-198; Edwards et al., Plant J. 8 (1995), 283-294). Für einige weitere Pflanzenspezies wurde das Vorhandensein mehrerer SSS-Isoformen mit Hilfe chromatographischer Methoden beschrieben, beispielsweise bei Gerste (Tyynelä und Schulman, Physiologia Plantarum 89 (1993) 835-841; Kreis, Planta 148 (1980), 412-416) und Weizen (Rijven, Plant Physiol. 81 (1986), 448-453). DNA-Sequenzen, die diese Proteine codieren, wurden jedoch bisher nicht beschrieben.

Um weitere Möglichkeiten bereitzustellen, beliebige stärkespeicherde Pflanzen dahingehend zu verändern, daß sie eine modifizierte Stärke synthetisieren, ist es erforderlich, jeweils DNA-Sequenzen zu identifizieren, die weitere Isoformen der Stärkesynthasen codieren.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung zu stellen, die an der Stärkebiosynthese beteiligte Enzyme codieren und mit deren

Hilfe es möglich t, gentechnisch verändere Pflanzen herzustellen, die eine erhöhte oder erniedrigt Aktivität dieser Enzyme aufweisen, wodurch es zu einer Veränderung der chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften der in diesen Pflanzen synthetisierten Stärke kommt.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher Nucleinsäuremoleküle, die Proteine mit der biologischen Aktivität einer löslichen Stärkesynthase des Typs I aus Mais codieren, wobei derartige Moleküle vorzugsweise Proteine codieren, die die unter Seq ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz umfassen. Insbesondere betrifft die Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder einen Teil davon enthalten, bevorzugt Moleküle, die die in Seq ID No. 1 angegebene codierende Region umfassen bzw. entsprechende Ribonucleotidsequenzen.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die eine lösliche Stärkesynthase aus Mais codieren und deren einer Strang mit einem der oben beschriebenen Moleküle hybridisiert oder mit einem komplementären Strang dieser Moleküle.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nucleinsäuremoleküle, die eine lösliche Stärkesynthase des Typs I aus Mais codieren und deren Sequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von den Nucleotidsequenzen der oben beschriebenen Moleküle abweicht.

Die Erfindung betrifft auch Nucleinsäuremoleküle, die eine Sequenz aufweisen, die zu der gesamten oder einem Teil der Sequenz der obengenannten Moleküle komplementär ist.

Bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen kann es sich sowohl um DNA- als auch RNA-Moleküle handeln. Entsprechende DNA-Moleküle sind beispielsweise genomische oder cDNA-Moleküle. Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen,

wie sie beisp sweise in Sambrock et al Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind. Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell aus jeder beliebigen Maispflanze stammen, die derartige Moleküle besitzt. Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken von Maispflanzen oder Maispflanzengewebe isoliert werden. Alternativ können sie durch gentechnische Methoden oder durch chemische Synthese hergestellt sein.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Moleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenz als Hybridisierungsprobe verwendeten aufweisen. Bei den Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erforderlich.

Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle, die eine erfindungsgemäße lösliche Stärkesynthase aus Mais codieren. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nucleinsäuremoleküle verstanden, die lang genug sind, um eines der beschriebenen Proteine zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich

State of State of the State of the

von den Sequenze der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheit in und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40 %, insbesondere eine Identität von mindestens 60 %, vorzugsweise über 80 % und besonders bevorzugt über 90 %. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Maissorten, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varian-

Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.

Wichtige Charakteristika einer Stärkesynthase sind: i) ihre Lokalisation im Stroma der Plastiden pflanzlicher Zellen; ii) ihre Fähigkeit zur Synthese linearer α -1,4-verknüpfter Polyglucane unter Verwendung von ADP-Glucose als Substrat. Diese

Aktivität kan die in Denyer und Smith (186 (1992), 606-617) oder wie in den Beispielen beschrieben bestimmt werden. Bei den durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen codierten Proteine handelt es sich um eine bisher nicht identifizierte und charakterisierte Form einer löslichen Stärkesynthase aus Mais, die dem Typ I ("primer independent") zugeordnet werden kann. Derartige Stärkesynthasen bzw. Nucleinsäuremoleküle, die derartige Proteine codieren, sind bisher aus Mais nicht beschrieben. Das codierte Protein weist eine gewisse Homologie zu einer löslichen Stärkesynthase aus Reis auf (Baba et al., Plant Physiol. 103 (1993), 565 - 573).

Gegenstand der Erfindung sind auch Oligonucleotide, die spezifisch mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül hybridisieren. Derartige Oligonucleotide haben vorzugsweise eine Länge von mindestens 10, insbesondere von mindestens 15 und besonders bevorzugt von mindestens 50 Nucleotiden. Sie sind dadurch gekennzeichnet, daß sie spezifisch mit erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, d.h. nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß mit Nucleinsäuresequenzen, die andere Proteine, insbesondere andere Stärkesynthasen codieren. Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können beispielsweise als Primer für eine PCR-Reaktion verwendet werden. Ebenso können sie Bestandteile von antisense-Konstrukten sein oder von DNA-Molekülen, die für geeignete Ribozyme codieren.

Ferner betrifft die Erfindung Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Elementen, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

Die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in prokaryontischen Zellen, beispielsweise in Escherichia coli, ist insofern interessant, als daß auf diese Weise eine genauere

Charakterisierung r enzymatischen Aktivitäten der Enzyme, für die diese Molekule codieren, ermöglich wird. Es ist insbesondere möglich, das Produkt, das von den entsprechenden Enzymen in Abwesenheit anderer, in der pflanzlichen Zelle an der Stärkesynthese beteiligter Enzyme synthetisiert wird, zu charakterisieren. Dies läßt Rückschlüsse zu auf die Funktion, die das entsprechende Protein bei der Stärkesynthese in der pflanzenzelle ausübt.

Darüber hinaus ist es möglich, mittels gängiger molekularbiologischer Techniken (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) verschiedenartige Mutationen in die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle einzuführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutanten möglich, bei denen durch fortschreitende Deletionen vom 5'- oder vom 3'- Ende der codierenden DNA-Sequenz Nucleinsäuremoleküle erzeugt werden, die zur Synthese entsprechend verkürzter Proteine führen. Durch derartige Deletionen am 5'-Ende der Nucleotidsequenz ist es beispielsweise möglich, Aminosäuresequenzen zu identifizieren, die für die Translokation des Enzyms in die Plastiden verantwortlich sind (Transitpeptide). Dies erlaubt es, gezielt Enzyme herzustellen, die durch Entfernen der entsprechenden Sequenzen nicht mehr in den Plastiden, sondern im Cytosol lokalisiert sind, oder aufgrund der Addition von andereren Signalsequenzen in anderen Kompartimenten lokalisiert sind.

Andererseits ist auch die Einführung von Punktmutationen denkbar an Positionen, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluß beispielweise auf die Enzymaktivität oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die einen veränderten Km-Wert besitzen oder nicht mehr den normalerweise in der Zelle vorliegenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen.

Des weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat- oder Produktspezifität aufweisen, wie z.B. Mutanten, die als Substrat ADP-Glucose-6-Phosphat anstatt ADP-Glucose verwenden. Weiterhin können Mutanten hergestellt wer-

den, die ein erändertes Aktivitäts-Te ratur-Profil aufweisen.

Für die gentechnische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (vgl. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden. Ferner können Manipulationen, passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Insertionen, Deletionen oder Wo stitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethode werden im allgemeinen eine Sequenzanalyse, eine Restriktionsanalyse und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, die mit einem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind, sowie Zellen, die von derart transformierten Zellen abstammen und ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül oder einen Vektor enthalten. Dabei handelt es sich vorzugsweise um bakterielle Zellen oder pflanzliche Zellen.

Gegenstand der Erfindung sind ferner die Proteine, die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codiert werden, sowie Verfahren zu deren Herstellung, wobei eine erfindungsgemäße Wirtszelle unter Bedingungen kultiviert wird, die die Synthese des Proteins erlauben, und anschließend das Protein aus den kultivierten Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

WU y //444 / 2 PCT/EP97/02527

Die vorliegende indung betrifft somit auch transgene Pflanzenzellen, die mit einem erfindungsgemäßen bleinsäuremolekül transformiert, d.h. genetisch modifiziert, wurden, sowie transgene Pflanzenzellen, die von derartig tranformierten Zellen abstammen und erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle enthalten.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle ist es nun möglich, mit Hilfe gentechnischer Methoden in den Stärkemetabolismus von Pflanzen einzugreifen, wie es bisher nicht möglich war, und ihn dahingehend zu verändern, daß es zur Synthese einer modifizierten Stärke kommt, die beispielsweise in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, der Stärkekorngröße und/oder Vergleich Stärkekornform im in Wildtyp-Pflanzen zu synthetisierter Stärke verändert ist. Durch eine Erhöhung der Aktivität der erfindungsgemäßen Proteine, beispielsweise durch Überexpression entsprechender Nucleinsäuremoleküle, oder durch die Bereitstellung von Mutanten, die nicht mehr den zelleigenen Regulationsmechanismen unterliegen und/oder unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten in bezug auf ihre Aktivität besitzen, besteht die Möglichkeit der Ertragssteigerung in entsprechend gentechnisch veränderten Pflanzen. Die wirtschaftliche Bedeutung der Möglichkeit des Eingriffs in die Stärkesynthese allein bei Mais ist offensichtlich: Mais ist weltweit die wichtigste Pflanze zur Stärkegewinnung. Ca. 80% der weltweit jährlich produzierten Stärke wird aus Mais gewonnen.

Möglich ist somit die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in pflanzlichen Zellen, um die Aktivität der entsprechenden löslichen Stärkesynthase zu erhöhen. Ferner ist es möglich, die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle nach dem Fachmann bekannten Methoden zu modifizieren, findungsgemäß Stärkesynthasen zu erhalten, die nicht mehr den zelleigenen Regulationsmechanismen unterliegen, bzw. veränderte oder Substrat-Temperaturabhängigkeiten bzw. duktspezifitäten aufweisen.

Die erfindungemäßen Zellen enthalten n erfindungsgemäßes Nucleinsäuremorekül, wobei dieses vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. insbesondere mit einem Promotor. Derartige Zellen lassen sich natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen unterscheiden, daß sie ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt oder dadurch, daß ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es sonst nicht vorkommt, d.h. in einer andereren genomischen Umgebung. Bei der Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in Pflanzen besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Um die Lokalisation in einem bestimmten Kompartiment zu erreichen, muß die die Lokalisation in Plastiden gewährleistende Sequenz deletiert werden und die verbleibende codierende Region gegebenenfalls mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten. Derartige Seguenzen sind bekannt (siehe beispielsweise Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95-106).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner auch Pflanzen, die erfindungsgemäße Zellen enthalten. Diese können z.B durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen nach dem Fachmann bekannten Methoden erhalten werden. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, insbesondere um stärkesynthetisierende bzw. stärkespeichernde Pflanzen, wie z.B. Getreidearten (Roggen, Gerste Hafer, Weizen etc.), Reis, Mais, Erbse, Maniok oder Kartoffel.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, das erfindungsgemäße Zellen enthält, beispielsweise Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge, Calluskulturen, Zellkulturen etc.

and the second s

WU 7/1444/2 PUT/EF9//0252/

Gegenstand der veriegenden Erfindung ist auch die aus den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzelle Pflanzen sowie Vermehrungsmaterial erhältliche Stärke.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren aufgrund der Expression bzw. zusätzlichen Expression eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls eine Stärke, die beispielsweise in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Insbesondere kann eine solche Stärke im Hinblick auf die Viskosität und/oder die Gelbildungseigenschaften von Kleistern dieser Stärke im Vergleich zu Wildtypstärke verändert sein.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind transgene Maispflanzenzellen, in denen die Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins verringert ist im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle ist es möglich, Maispflanzenzellen und Maispflanzen zu erzeugen, bei denen die Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins verringert ist. Dies führt ebenfalls zur Synthese einer Stärke mit veränderten chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften verglichen mit Stärke aus Wildtyp-Pflanzenzellen.

Die Herstellung von Maispflanzenzellen mit einer verringerten Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins kann beispielsweise erzielt werden durch die Expression einer entsprechenden antisense-RNA, einer sense-RNA zur Erzielung eines Cosuppressionseffektes oder die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyms, das spezifisch Transkripte spaltet, die eines der erfindungsgemäßen Proteine codieren, unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle.

Das Verfahren zur Verringerung der Aktivität erfindungsgemäßer Enzyme in den Pflanzenzellen durch einen Cosuppressionseffekt ist dem Fachmann bekannt und ist beispielsweise in Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al.

(Curr. Top. Marcobiol. Immunol. 197 (199 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621) und anderen Quellen.

Die Expression von Ribozymen zur Verringerung der Aktivität von bestimmten Enzymen in Zellen ist dem Fachmann ebenfalls bekannt und ist beispielsweise beschrieben in EP-B1 0 321 201. Die Expression von Ribozymen in pflanzlichen Zellen wurde z.B. beschrieben in Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250 (1996), 329-338).

Vorzugsweise wird zur Reduzierung der Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins in pflanzlichen Zellen eine antisense-RNA exprimiert.

Hierzu kann zum einen ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte ein erfindungsgemäßes Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um in den Zellen einen antisense-Effekt zu bewirken. Es können im allgemeinen Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise einer Länge von 100-500 bp, für eine effiziente antisense-Inhibition insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 bp verwendet werden. In der Regel werden DNA-Moleküle verwendet, die kürzer als 5000 bp, vorzugsweise Sequenzen, die kürzer als 2500 bp sind.

Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den Sequenzen der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle aufweisen, aber nicht vollkommen identisch sind. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100 % ist zu bevorzugen.

Gegenstand der Erfindung sind auch Maispflanzen, die erfindungsgemäße transgene Maispflanzenzellen enthalten. Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, insbesondere Samen.

Gegenstand der findung ist auch die aus den vorgehend beschriebenen transgenen Maispflanzenzellen, aispflanzen sowie Vermehrungsmaterial erhältliche Stärke.

Die erfindungsgemäßen transgenen Maispflanzenzellen und Maispflanzen synthetisieren aufgrund der Verringerung der Aktivität eines der erfindungsgemäßen Proteine eine Stärke, die beispielsweise in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatge-Verkleisterungsverhalten, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen Stärke verändert ist. Diese synthetisierter Viskositäten und/oder Gelbilbeispielsweise veränderte dungseigenschaften ihrer Kleister zeigen im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen.

Die erfindungsgemäßen Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Grundsätzlich läßt sich die Einsatzmöglichkeit der Stärke in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfaßt die Stärke, hauptsächlich Glucose Hydrolyseprodukte der Glucanbausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Für eine Reduktion der Kosten kann hierbei die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens von Bedeutung sein. Gegenwärtig verläuft es im wesentlichen enzymatisch unter Amyloglucosidase. Vorstellbar wäre von Verwendung Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z.B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch geringeren Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

Der andere Bereich, in dem die Stärke wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet wird, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

1. Nahrungsmittelindustrie

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wäßrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließund Sorptionsverhalten, die Quellund kleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

2. Nicht-Nahrungmittelindustrie

In diesem großen Bereich kann die Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappeindustrie zu nennen. Die Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen). der Abbindung Füllstoffund von Feinstoffteilchen, als Festigungsstoff zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

2.1 Papier- und Pappeindustrie

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden.

Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißegrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoff-

gehalt, eine gepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hone Pigmentaffinität eine ntige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfließ von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

2.2 Klebstoffindustrie

Ein großer Einsatzbereich der Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90 % der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungsleim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

2.3 Textil- und Textilpflegemittelindustrie

Ein großes Einsatzfeld für die Stärken als Hilfmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d.h. als Hilfsstoff zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, Stärke als Mittel zur Textilaufrüstung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne.

2.4 Baustoff ustrie

Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung der Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischte Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeton werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

2.5 Bodenstabilisation

Ein weiterer Markt für die Stärke bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus der Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

2.6 Einsatz bei Pflanzenschutz- und Düngemitteln Ein Einsatzbereich liegt bei der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So kann die Stärke zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt werden.

2.7 Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln einge-

setzt werder Weiterhin kann die Stärte als Tablettensprengmittel dienen, da sie nach dem Schacken Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit soweit quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.

2.8 Stärkezusatz zu Kohlen und Briketts

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Brikett. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. brikettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6 %, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5 %. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemittel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

2.9 Erz- und Kohleschlammaufbereitung
Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammaufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

2.10 Gießereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittel-versetzten Sänden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist.

Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darüber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

2.11 Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

2.12 Herstellung von Lederersatzstoffen

Eine weitere Absatzmöglichkeit der modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

2.13 Stärke in synthetischen Polymeren

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den
Verarbeitungsprozess (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht
keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und
Stärke) oder alternativ die Einbindung von
Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren
(Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyäthylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 'master batch' kombiniert, aus dem mit granu-: 1 zu einem liertem Polyäthylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in Polyäthylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, ein verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wäßrigen Farben erreicht werden.

21

Eine andere Möglekeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärke sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufrißdichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50 % herzustellen. Des weiteren sind Stärke/ Polymermischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögen Stärkepfropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Monomers. Die synthetischen Seitengitters eines verfügbaren Stärkepfropfpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten wie Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpillierungen.

Entscheidend für den Einsatz der neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallinität, zum ande-

ren auch die genschaften, die in folg de Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur und transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Eingriffe in einer transgenen Pflanze kann zum einen die Eigenschaften der aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Verfahren nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können die durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch

- Hitzebehandlung,
- Säurebehandlung,
- Oxidation und
- Veresterungen,

welche zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Weitere organische Säuren können ebenfalls zur Veresterung eingesetzt werden:

- Erzeugung von Stärkeethern Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-Carboxylmethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige Stärkeether, S-haltige Stärkeether
- Erzeugung von vernetzten Stärken
- Erzeugung von Stärke-Pfropf-Polymerisaten

Zur Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in sense- oder antisense-Orientierung in pflanzlichen Zellen wer-

But the same of the same than the same

den diese mit regetorischen DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewerleisten. zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage. Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In Bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Geeignete Promotoren für eine konstitutive Expression sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der eine knollenspezifische Mais, Ubiquitin-Promotor aus für Expression in Kartoffeln der Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., (1989), 2445-2451) oder für eine endospermspezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor oder Promotoren von Zein-Genen aus Mais.

Ferner kann eine Terminationssequenz vorhanden sein, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Die vorliegende Erfindung stellt Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung, die eine neue in Mais identifizierte Form einer löslichen Stärkesynthase codieren. Dies erlaubt nun sowohl die Identifizierung der Funktion dieser Stärkesynthase bei der Stärkebiosynthese, als auch die Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen, bei denen die Aktivität dieses Enzyms verändert ist. Dies ermöglicht die Synthese einer Stärke mit veränderter Struktur und somit veränderten physikalisch-chemischen Eigenschaften in derartig manipulierten Pflanzen.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können prinzipiell auch dazu verwendet werden, Pflanzen herzustellen, bei denen die Aktivität der erfindungsgemäßen Stärkesynthase erhöht oder

verringert is und gleichzeitig die Akti aten anderer, an der Stärkebiosynthese beteiligter Enzyme verändert sind. Dabei sind Kombinationen und Permutationen denkbar. Veränderung der Aktivitäten einer oder mehrerer Isoformen der Stärkesynthasen in Pflanzen kommt es zur Synthese einer in ihrer Struktur veränderten Stärke. Durch die Steigerung der Aktivität einer oder mehrerer Isoformen der Stärkesynthasen in Zellen der stärkespeichernden Gewebe transformierter Pflanzen wie z.B. in dem Endosperm von Mais oder Weizen oder in der Knolle bei der Kartoffel kann es darüber hinaus zu einer Ertragssteigerung kommen. Beispielsweise können säuremoleküle, die für ein erfindungsgemäßes Protein codieren entsprechende antisense-Konstrukte, in Pflanzenzellen eingebracht werden, bei denen bereits die Synthese endogener GBSS I-, SSS- oder GBSS II-Proteine aufgrund eines antisense-Effektes oder einer Mutation inhibiert ist oder die Synthese des Verzweigungsenzyms inhibiert ist (wie z.B. beschrieben in WO92/14827 oder der ae-Mutante (Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch: Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86)).

Soll die Inhibierung der Synthese mehrerer Stärke-Synthasen in transformierten Pflanzen erreicht werden, so können DNA-Moleküle zur Transformation verwendet werden, die gleichzeitig mehrere, die entsprechenden Stärkesynthasen codierenden Regionen in antisense-Orientierung unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors enthalten. Hierbei kann alternativ jede Sequenz unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehen, oder die Sequenzen können als Fusion von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden. Letztere Alternative wird in der Regel vorzuziehen sein, da in diesem Fall die Synthese der entsprechenden Proteine in etwa gleichem Maße inhibiert werden sollte. Weiterhin ist die Konstruktion von Molekülen möglich, die neben Stärkesynthasen codierenden Sequenzen weitere DNA-Sequenzen enthalten, die andere an der Stärkesynthese oder -modifikation beteiligte Proteine codieren. Diese sind jeweils in antisense-Orientierung an einen geeigneten Promotor gekoppelt. Die Sequenzen können hierbei wiederum hintereinandergeschaltet sein und von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden oder aber von getrennten Promotoren transkribiert werden. Für die

10 10 10 10 10

April Same

PCT/EP97/02527

Länge der einzel codierenden Regionen, die in einem derartigen Konstrukt verwendet werden, gilt das vas oben bereits für die Herstellung von antisense-Konstrukten ausgeführt wurde. Eine obere Grenze für die Anzahl der in einem derartigen DNA-Molekül von einem Promotor aus transkribierten antisense-Fragmente gibt es nicht. Das entstehende Transkript sollte aber in der Regel eine Länge von 10 kb, vorzugsweise von 5 kb nicht überschreiten.

Codierende Regionen, die in derartigen DNA-Molekülen in Kombination mit anderen codierenden Regionen in antisense-Orientierung hinter einem geeigneten Promotor lokalisiert sind, können aus DNA-Sequenzen stammen, die für folgende Proteine codieren: Stärkekorn-gebundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme, "Debranching"-Enzyme, Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylasen. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung. Auch die Verwendung anderer DNA-Sequenzen im Rahmen einer derartigen Kombination ist denkbar.

Mit Hilfe derartiger Konstrukte ist es möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

Weiterhin können die Konstrukte in klassische Mutanten eingebracht werden, die für ein oder mehrere Gene der Stärkebiosynthese defekt sind (Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch:Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86). Diese Defekte können sich auf folgende Proteine beziehen: Stärkekorn-gebundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme (BE I und II), "Debranching"-Enzyme (R-Enzyme), Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylasen. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung.

Mit Hilfe einer derartigen Vorgehensweise ist es weiterhin möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren. Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Clonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E.coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien,

26 pACYC184 usw Die gewünschte Sequenz k an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E.coli-Zellen Transformierte E.coli-Zellen werden geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethode Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden cloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, sollte vorteilhafterweise ein selektierbares Markergen anwesend sein.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können gegebenenfalls weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so sollte mindestens die rechte Begrenzung, vorteilhafterweise jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, sollte die einzuführende DNA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von

The section of the section of

The second secon

Sequenzen, die halog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-P mid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. Mol. Gen. Genet. (1978), 181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium sollte ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm,

I Market Land and the second

G. Reed, A. Phler, P. Stadler, eds.) ol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New Ork-Basel-Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von Agrobacterium tumefaciens wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels Agrobacterium basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes, die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern.

Spezifisch die Transformation von Mais wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (vgl. z.B. W095/06128, 0 513 849; EP 0 465 875). In EP 292 435 wird ein Verfahren beschrieben, mit Hilfe dessen, ausgehend von einem schleimlosen, weichen (friable) granulösen Mais-Kallus, fertile Pflanzen erhalten werden können. Shillito et al. (Bio/Technology 7 (1989), 581) haben in diesem Zusammenhang beobachtet, daß es ferner für die Regenerierbarkeit zu fertilen Pflanzen notwendig ist, von Kallus-Suspensionskulturen auszugehen, aus denen eine sich teilende Protoplastenkultur, mit der Fähigkeit zu Pflanzen zu regenerieren, herstellbar ist. Nach einer Kultivierungszeit von 7 bis 8 Monaten erhalten Shillito et al. Pflanzen mit lebensfähigen Nachkommen, die jedoch Abnormalitäten in der Morphologie und der Reproduktivität aufweisen.

Prioli und Söndahl (Bio/Technology 7 (1989), 589) beschreiben die Regeneration und die Gewinnung fertiler Pflanzen aus Mais-Protoplasten der Cateto Mais-Inzuchtlinie Cat 100-1. Die Autoren vermuten, daß die Protoplasten-Regeneration zu fertilen Pflanzen abhängig ist von einer Anzahl verschiedener Faktoren, wie z.B. von Genotyp, vom physiologischen Zustand der Donor-Zellen und von den Kultivierungsbedingungen.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der

the state of the s

WU y //444 / Z PCT/EP9 // UZ527

den transformiert Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzenzellen können Samen gewonnen werden.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Figur 1 zeigt schematisch den Vektor pUBİbar.

Ubiquitin-Pro = Ubiquitinpromotor

Intron = Intron aus Mais

nos = Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens aus A. tumefaciens

35S = 35S-Promotor des CaMV

T35S = 35S-Terminator des CaMV

Figur 2 zeigt schematisch den Vektor pUBI-bar-aMasy
Ubiquitin-Pro = Ubiquitinpromotor

Intron = Intron aus Mais

nos = Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens aus A. tumefaciens

35S = 35S-Promotor des CaMV

T35S = 35S-Terminator des CaMV

Dieser Vektor enthält in antisense-Orientierung zum Ubiquitinpromotor die in Beispiel 1 beschriebene cDNA, die eine Stärkesynthase aus Mais codiert.

30

Die Beispiele rläutern die Erfindung.

In den Beispielen verwendete Medien und Lösungen:

20 x SSC

175,3 g NaCl

88,2 g Natrium-Citrat ad 1000 ml mit ddH_2O pH 7,0 mit 10 N NaOH

ΥT

8 g Bacto-Yeast extract

5 g Bacto-Tryptone

5 g NaCl

ad 1000 ml mit ddH_2O

Protoplastenisolierungsmedium (100 ml)

Cellulase Onozuka R	S (Meiji	Seika,	Japan)	800	mg
Pectolyase Y 23				40	mg
KNO ₃				200	mg
KH ₂ PO ₄				136	mg
K ₂ HPO ₄				47	mg
CaCl ₂ 2H ₂ O				147	mg
MgSO ₄ 7H ₂ O				250	mg
Rinderserumalbumin	(BSA)			20	mg
Glucose			•	4000	mg
Fructose			•	4000	mg
Saccharose				1000	mg ·
pН		* **	.*	. 5	, 8
Osmolarität			•	660	mosm.

Protoplastenwaschlösung 1: wie Protoplastenisolierlösung, aber ohne Cellulase, Pectolyase und BSA

Transformationspuffer

a)	Glucose	0,5 M
	MES '	0,1 %
	MgCl ₂ 6H ₂ 0	25 mM

PC17EP97/02527 WU 7/1444/4

31

Нq 5,8 auf 600 mosm. einstellen

b) PEG 6000-Lösung

0,5 M Glucose MgCl₂ 6H₂0 100 mM 20 mM Hepes 6,5 рΗ

Dem obigen Puffer unter b) wird PEG 6000 kurz vor Gebrauch der Lösung zugesetzt (40 Gew.-% PEG). Die Lösung wird durch ein 0,45 µm Sterilfilter filtriert.

W5 Lösung

CaCl ₂	125	mM
NaCl	150	mΜ
KCl	5	mΜ
Glucose	50	mM

Protoplasten-Kulturmedium (Angaben in mg/l)

KNO ₃	3000
(NH ₄) ₂ SO ₄	500
MgSO ₄ 7H ₂ 0	350
KH ₂ PO ₄	400
CaCl ₂ 2H ₂ O	300

Fe-EDTA und Spurenelemente wie im Murashige-Skoog-Medium (Physiol. Plant, 15 (1962), 473).

m-Inosit	100
Thiamin HCl	1,0
Nicotinsäureamid	0,5
Pyridoxin HCl	0,5
Glycin	2,0
Glucuronsäure	750
Galacturonsäure	750
Galactose	500
Maltose	500

32

	J N	
Glucose	.000	
Fructose	36.000	
Saccharose	30.000	
Asparagin	500	
Glutamin	100	
Prolin	300	
Caseinhydrolysat	500	
2, 4 Dichlorphenoxyessigsäure	(2,4-D) 0,5	
рН	5,8	
Osmolarität	600	mosm.

In den Beispielen werden die folgenden Methoden verwendet:

1. Clonierungsverfahren

Zur Clonierung in E.coli wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.

2. Bakterienstämme

Für den Bluescript-Vektor und für die pUSP-Konstrukte wurde der E.coli-Stamm DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet. Für die in vivo excision wurde der E.coli-Stamm XL1-Blue verwendet.

3. Transformation von Mais

(a) Herstellung von Protoplasten der Zellinie DSM 6009

Protoplastenisolierung

2 - 4 Tage, vorzugsweise 3 Tage nach dem letzten Mediumswechsel einer Protoplastensuspensionskultur wird das Flüssigmedium abgesaugt und die zurückbleibenden Zellen mit 50 ml Protoplastenwaschlösung 1 gespült und nochmals trockengesaugt. Zu jeweils 2 g der geernteten Zellmasse wird 10 ml Protoplastenisolierungsmedium gegeben. Die resuspendierten Zellen und Zellaggregate werden bei 27 ± 2° C unter leichtem Schütteln (30 bis 40 rpm) 4 bis 6 h im Dunkeln inkubiert.

Protoplas

Sobald die Freisetzung von mindestens 1 Mio. Protoplasten/ml erfolgt ist (mikroskopische Beobachtung), wird die Suspension durch ein Edelstahl- und Nylonsieb von 200 bzw. 45 μm Maschenwerte gesiebt. Die Kombination eines 100 μm und eines 60 μm Siebs ermöglicht die Abtrennung der Zellaggregate genauso gut. Das protoplastenhaltige Filtrat wird mikroskopisch beurteilt. Üblicherweise enthält es 98 - 99 % Protoplasten. Der Rest sind unverdaute Einzelzellen. Protoplastenpräparationen diesem Reinheitsgrad werden ohne Gradientenzentrifugation für Transformationsexperimente Zentrifugation (100 Durch verwendet. Aufschwingrotor (100 x g, 3 min) werden die Protoplasten sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und die Waschlösung 1 resuspendiert. Die Protoplasten in Zentrifugation wird wiederholt und die Protoplasten danach im Transformationspuffer resuspendiert.

(b) Protoplastentransformation

Die in Tranformationspuffer resuspendierten Protoplasten werden bei einem Titer von 0,5 - 1 x 10⁶ Protoplasten/ml in 10 ml Portionen in 50 ml Polyallomer-Röhrchen eingefüllt. Die zur Transformation verwendete DNA wird in Tris-EDTA (TE) Puffer gelöst. Pro ml Protoplastensuspension werden 20 µg Plasmid-DNA zugegeben. Als Vektor wird dabei ein Phosphinotricinresistenz vermittelndes Plasmid verwendet (vgl. z.B. EP 0 513 849). Nach der DNA-Zugabe wird die Protoplastensuspension vorsichtig geschüttelt, um die DNA homogen in der Lösung zu verteilen. Sofort danach wird tropfenweise 5 ml PEG-Lösung zugetropft.

Durch vorsichtiges Schwenken der Röhrchen wird die PEG-Lösung homogen verteilt. Danach werden nochmals 5 ml PEG-Lösung zugegeben und das homogene Durchmischen wiederholt. Die Protoplasten verbleiben 20 min der PEG-Lösung bei ± 2° C. Danach werden die Protoplasten durch

34

3-mininges Zentrifugieren (10 g; 1000 Upm) sedimentrert. Der Überstand wird verworfen. Die Protoplasten werden durch vorsichtiges Schütteln in 20 ml W5-Lösung gewaschen und danach erneut zentrifugiert. Danach werden sie in 20 ml Protoplastenkulturmedium resuspendiert, nochmals zentrifugiert und erneut in Kulturmedium resuspendiert. Der Titer wird auf 6 - 8 x 10⁵ Protoplasten/ml eingestellt und die Protoplasten in 3 ml Portionen in Petrischalen (ø 60 mm, Höhe 15 mm) kultiviert. Die mit Parafilm versiegelten Petrischalen werden bei 25 ± 2° C im Dunkeln aufgestellt.

(c) Protoplastenkultur

Während der ersten 2 - 3 Wochen nach der Protoplastenisolierung und -transformation werden die Protoplasten ohne Zugabe von frischem Medium kultiviert. Sobald sich die aus den Protoplasten regenerierten Zellen zu Zellaggregaten mit mehr als 20 - 50 Zellen entwickelt haben, wird 1 ml frisches Protoplastenkulturmedium zugegeben, das als Osmoticum Saccharose (90 g/l) enthält.

- (d) Selektion transformierter Maiszellen und Pflanzenregeneration
 - 3 10 Tage nach der Zugabe von frischem Medium können die aus Protoplasten entstandenen Zellaggregate auf Agar-Medien mit 100 mg/l L-Phosphinothricin plattiert werden. N6-Medium mit den Vitaminen des Protoplasten-kulturmediums, 90 g/l Saccharose und 1,0 mg/l 2,4D ist ebenso geeignet wie ein analoges Medium beispielsweise mit den Makro- und Mikronährsalzen des MS-Mediums (Murashige und Skoog (1962), siehe oben).

Auf dem Selektivmedium können die aus stabil transformierten Protoplasten hervorgegangenen Kalli ungehindert weiterwachsen. Nach 3 - 5 Wochen, vorzugsweise 4 Wochen können die transgenen Kalli auf frisches Selektionsmedium transferiert werden, welches ebenfalls 100

mg/l L-Phophinothricin enthält, das aber kein Auxin mehr enthärt. Innerhalb von 3 - 5 Wo n differenzieren ca. 50 % der transgenen Maiskalli, die das L-Phosphinothricinacetyltransferase-Gen in ihr Genom integriert haben, auf diesem Medium in Gegenwart von L-Phosphinothricin erste Pflanzen.

(e) Aufzucht transgener Regeneratpflanzen

Das embryogene transformierte Maisgewebe wird auf hormonfreiem N6-Medium (Chu C.C. et al., Sci. Sin. 16 (1975), 659) in Gegenwart von 5x10⁻⁴ M L-Phosphinothricin kultiviert. Auf diesem Medium entwickeln sich Maisembryonen, die das Phsphinothricinacetyltransferase-Gen (PAT-Gen) hinreichend stark exprimieren, Pflanzen. Nicht transformierte Embryonen oder solche mit nur sehr schwacher PAT-Aktivität sterben ab. Sobald die Blätter der in vitro-Pflanzen eine Länge von 4 - 6 mm erreicht haben, können diese in Erde transferiert werden. Nach Abwaschen von Agarresten an den Wurzeln werden die Pflanzen in ein Gemisch von Lehm, Sand, Vermiculit und Einheitserde im Verhältnis 3:1:1:1 gepflanzt und während der ersten 3 Tage nach dem Verpflanzen bei 90 - 100 % relativer Luftfeuchte an die Erdkultur adaptiert. Die Anzucht erfolgt in einer Klimakammer mit 14 h Lichtperiode ca. 25000 Lux in Pflanzenhöhe bei einer Tag/Nachttemperatur von 23 ± 1/17 ± 1° C. Die adaptierten Pflanzen werden bei einer Luftfeuchte von 65 ± 5 % kultiviert.

4. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Random Primer Labelling Kits der Firma Boehringer (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

PCT/EP97/02527

Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die eine neue Isoform einer Stärkesynthase aus Zea mays codiert

Um eine neue lösliche Stärkesynthase aus Mais zu isolieren, wurden polyclonale Antikörper gegen Peptid 1 hergestellt.

Peptid 1: NH2-GTGGLRDTVENC-COOH (Seq. ID No. 3)

Dieses Peptid wurde an den KLH-Carrier ("keyhole limpet homocyanin") gekoppelt und anschließend zur Herstellung polyclonaler Antikörper in Kaninchen verwendet (Eurogentec, Seraing, Belgien).

Der resultierende Antikörper wurde als anti-SS1 bezeichnet.

Der Antikörper anti-SS1 wurde anschließend verwendet, um eine cDNA-Bibliothek aus Mais nach Sequenzen durchzumustern, lösliche Stärkesynthasen aus Mais codieren. Hierfür wurde eine cDNA-Bibliothek aus Endosperm-polyA⁺ RNA, angelegt im Vektor λ -ZAP, verwendet. Zur Analyse der Phagenplaques wurden diese auf Nitrozellulosefilter übertragen, die vorher für 30-60 min. in einer 10 mM IPTG-Lösung inkubiert und anschließend auf Filterpapier getrocknet wurden. Der Transfer erfolgte für 3 h bei 37°C. Anschließend wurden die Filter für 30 min. bei Raumtemperatur in Blockreagenz inkubiert und zweimal für 5-10 min. in TBST-Puffer gewaschen. Die Filter wurden mit dem polyclonalen Antikörper anti-SS1 in geeigneter Verdünnung für 1 h bei Raumtemperatur oder für 16 h bei 4°C geschüttelt. Die Identifizierung von Plaques, die ein Protein exprimierten, das von dem Antikörper anti-SS1 erkannt wurde, erfolgte mit Hilfe des "Blotting detection kit for rabbit antibodies RPN 23" (Amersham UK) nach den Angaben des Herstellers.

Phagenclone der cDNA-Bibliothek, die ein Protein exprimierten, das von dem Antikörper anti-SS1 erkannt wurde, wurden unter Anwendung von Standardverfahren weiter gereinigt. Mit Hilfe der in vivo excision-Methode (Stratagene) wurden von positiven Phagenclonen E.coli-Clone gewonnen, die ein doppelsträngiges pBlueskript II SK-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion zwischen der EcoRI- und der Xho I-Schnittstelle ds Polylinkers enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmu-

sters der Inserti n wurde ein geeigneter Clon einer Sequenzanalyse unterzogen.

Beispiel 2

Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pSSS1

Aus einem entsprechend Beispiel 1 erhaltenen E. coli-Clon wurde das Plasmid pSSS1 isoliert und seine cDNA-Insertion durch Standardverfahren mittels der Didesoxynucleotidmethode (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467) bestimmt. Die Insertion ist 2383 bp lang und stellt eine partielle cDNA dar. Die Nucleotidsequenz ist unter Seq ID No. 1 angegeben. Die korrespondierende Aminosäuresequenz ist unter Seq ID No. 2 dargestellt.

Eine Sequenzanalyse und ein Sequenzvergleich mit bekannten Sequenzen zeigte, daß die unter Seq ID No. 1 dargestellte Sequenz neu ist und eine neue lösliche Stärkesynthase des Typs I aus Mais codiert. Die partielle codierende Region weist Homologie zu Stärkesynthasen aus verschiedenen Organismen auf, insbesondere zu einer Stärksynthase aus Reis. Das durch diese cDNA-Insertion oder durch hybridisierende Sequenzen codierte Protein wird im Rahmen dieser Anmeldung als SSS1Zm bezeichnet. Mit Hilfe dieser partiellen cDNA-Sequenz ist es für eine in der Molekularbiologie erfahrene Person ohne weiteres möglich, die Region enthaltende Vollängenclone codierende isolieren und ihre Sequenzen zu bestimmen. Dazu wird z.B. eine blattspezifische cDNA-Expressionsbank aus Zea mays, Linie B73 (Stratagene GmbH, Heidelberg), nach Standardverfahren mittels Hybridisierung mit einem 5'-Fragment der cDNA-Insertion des Plasmids pSSS1 (200 bp) auf Vollängen-Clone hin durchgemustert. So erhaltene Clone werden sodann sequenziert. Eine andere Möglichkeit zum Erhalt der noch fehlenden 5'-terminal gelegenen Sequenzen besteht in der Anwendung der 5'-Race Methode (Stratagene o.vgl. Hersteller).

PCT/EP97/02527

Konstruktion des Pflanzentransformationsvektor pUBI-bar-aMASY und Herstellung transgener Maispflanzen

38

Zur Herstellung eines Pflanzentransformationsvektors, der eine antisense-RNA zu einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül codiert, wurde der Vektor pUBIbar (siehe Figur 1) mit dem Restriktionsenzym HpaI linearisiert mit alkalischer und Phosphatase dephosphoryliert. In den linearisierten Vektor wurde die gemäß Beispiel 1 isolierte cDNA (ca. 2,4 cloniert, die als EcoRV/SmaI-Fragment aus dem pBluescriptSK-Plasmid gewonnen worden war. Durch Restriktionsanalyse wurde ein Plasmid identifiziert, das die die Stärkesynthase aus Mais coierende cDNA in antisense-Orientierung im Verhältnis zum Promotor enthielt. Dieses Plasmid wurde pUBI-bar-aMasy genannt. Dieser Vektor enthält einen Ubiquitin-Promotor und ein Intron aus Mais (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18 (1992), 675-689), das Transkriptionsterminationssignal des Nopalinsynthase-Gens aus A. tumefaciens (Depicker et al., J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 561-573), das bar-Markergen (Thompson et al., EMBO J. 6 (1987), 2519-2523), das die codierende Region des Bialaphos-Resistenzgens aus Streptomyces hygroscopicus umfaßt, sowie den 35S-Promotor und -Terminator des CaMV (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294) in Verbindung mit dem bar-Gen. Ferner enthält das Plasmid zwischen dem Intron und dem nos-Terminator in antisense-Orientierung zum Ubiquitin-Promotor die cDNA codierend die Stärkesynthase aus Mais.

Das Plasmid ist in Figur 2 dargestellt.

Der Vektor pUBI-bar-aMasy wurde mittels der oben beschriebenen Methode in Maisprotoplasten eingeführt. Es wurden dabei 4,8 x 10^7 Protoplasten verwendet und 100 μ g Plasmid-DNA.

Es wurden 408 Phosphinothricin-resistente Clone erhalten. Von diesen wurden 40 hinsichtlich der Expression der einge-brachten DNA analysiert. Dies ergab, daß 12 der erhaltenen Clone, die eingebrachte DNA exprimierten. Sechs dieser Clone wurden zu ganzen Pflanzen regeneriert und ins Gewächshaus transferiert.

WO 97/44472

SEQUENZPROTOKOLL

PCT/EP97/02527

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER:
 - (A) NAME: PlantTec Biotechnologie GmbH, Forschung & Entwicklung
 - (B) STRASSE: Hermannswerder 14
 - (C) ORT: Potsdam
 - (E) LAND: Deutschland
 - (F) POSTLEITZAHL: 14473
 - (G) TELEFON: +49 331 275670
 - (H) TELEFAX: +49 331 2756777
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nucleinsaeuremolekuele codierend loesliche Staerkesynthase aus Mais
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 3
- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
 - (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:
 - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 2383 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (iv) ANTISENSE: NEIN
 - (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Zea mays
 - (F) GEWEBETYP: Endosperm
 - (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE:2..1950

. 20

- (D) SONSTIGE ANGABEN: /Funktion= "Staerkesynthese" /Produkt= "loesliche Staerkesynthase"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:
- G GCA CGA GGT CTG CTC TCC CTC TCC GCA ATG GCG ACG CCC TCG GCC 46 Ala Arg Gly Leu Leu Ser Leu Ser Ala Met Ala Thr Pro Ser Ala 10
- Val Gly Ala Ala Cys Leu Leu Leu Ala Arg Ala Ala Trp Pro Ala Ala 30

						-	40),						
	GAC Asp		CGC Arg	CCG Pro	CGG Arg	CGG Arg 40	CTC Leu	CAG Gln	CGC Arg	Gie Val	CTG Leu 45	CGC Arg	CGC Arg	142
	GTC Val 50													190
	GCG Ala							Pro						238
	GAG Glu													286
	GGC Gly													334
	ATC Ile													382
	GTT Val 130													430
	GTA Val													478
	GTT Val			Leu										526
	ATG Met													574
	GCA Ala													622
	GGT Gly 210													670
	TGG Trp													718

										ЧІ							
	TTA	TAT	GGA	GAT	AAG	7	GGT	GCT	TTT		GAT	AAT	CAG	TTC	AGA	TAC	766
				Asp									Gln				
	240					245					250				,	255	
				500	mam	com	222	mam	C2.C	COTT	CCT	ጥጥር	CTC	Cdd	CDD	TTG	814
				TGC Cys													014
	Thr	Leu	Leu	Cys	260	Ala	ATA	Cys	GIU	265	110	ביים	VU	204	270		
					200												
	GGA	GGA	TAT	ATT	TAT	GGA	CAG	AAT	TGC	ATG	TTT	GTT	GTC	TAA	GAT	TGG	862
	Gly	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Gln	Asn	Суз	Met	Phe	Val	Val		Asp	Trp	
-				275		•			280					285			
	САТ	GCC	ACT	CTA	GTG	CCA	GTC	بلىلى	СТТ	GCT	GCA	AAA	TAT	AGA	CCA	TAT	910
				Leu													
			290					295				•	300	_		•	
				AAA													958
	Gly		Tyr	Lys	Asp	Ser	Arg	Ser	He	Leu	vai	315	HIS	ASN	Leu	Ala	
		305					310					313					
	CAT	CAG	GGT	GTA	GAG	CCT	GCA	AGC	ACA	TAT	CCT	GAC	CTT	GGG	TTG	CCA	1006
				Val													
	320					325					330					335	
							ama.	220	mca	CM3	TO CO	COT	C 3 3	TCC	ccc	NGG	1054
	CCT	GAA	TGG	TAT Tyr	GGA	GCT NJ =	CTG	GAG	TGG	Ual	Dhe	Pro	GAA	Trn	Ala	Ara	1034
	PIO	GIU	ırp	IYL	340	W7.0	nea	GI W	**P	345					350		:
								•									
				CTT													1102
	Arg	His	Ala	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu		Val	Asn	Phe	Leu	Lys 365	GIA	Ala	
				355					360					202			
	GTT	GTG	ACA	GCA	GAT	CGA	ATC	GTG	ACT	GTC	AGT	AAG	GGT	TAT	TCA	TGG	1150
				Ala													
			370					375					380				
											ama		~ A A	ama	mm x	N.C.C	1180
•				ACT Thr													1198
	GIU	385	Int	Int	MIA	Giu	390	GIY	G111	GIY	Deu	395	GIU	200	200	501	
		303															
																AAT	1246
			Lys	Ser	Val		Asn	Gly	Ile	Val		Gly	Ile	Asp	Ile	Asn	
	400					405					410					415	
	ርአጥ	TGG	AAC	. ככיד	GCC	ÁCA	GAC	AAA	TGT	ATC	CCC	TGT	CAT	TAT	TCT	GTT	1294
				Pro													
		•			420			·	· .	425				•	430		
					~.		• .						<i>5</i> ′	~ ~ ~			3345
	GAT	GAC	CTC	TCT	GGA	AAG	GCC	AAA	TGT	AAA	GGT	GCA	TTG	CAG	AAG	GAG	1342
	Asp	Asp	Leu			Lys	Ala	Lys	440		GIY	Ald	rea	445		Glu	
				435		• 1	٠		-30								
	CTG	GGT	TTA	CCT	ATA	AGG	CCI	GAT	GTT	CCT	CTG	ATT	GGC	TTT	TTA	' GGA	1390
	Leu	Gly	Leu	Pro	Ile	Arg	Pro	Asp	Val	Pro	Leu	Ile	Gly	Phe	Ile	Gly	
		-	450					455					460	:			

the control of the second of t

WO 31144412						PC1/EP97/0	2527
			42	•			
AGA TTG GAT	TAT A	AA GGC ATT	GAT CTC	ATT CAA	ATC A	ATA CCA	1438
Arg Leu Asp	Tyr L	ys Gly Ile	Asp Leu	Ile Gln	Led Ile	Ile Pro	
465		470		475			
GAT CTC ATG	CGG GAA G	AT GTT CAA	TTT GTC	ATG CTT	GGA TCT	GGT GAC	1486
Asp Leu Met	Arg Glu A	sp Val Gln	Phe Val	Met Leu	Gly Ser	Gly Asp	
480		85		490		495	
CCA GAG CTT	GAA GAT TO	GG ATG AGA	TCT ACA	GAG TCG	ATC TTC	AAG GAT	1534
Pro Glu Leu	Glu Asp T	rp Met Arg	Ser Thr	Glu Ser	Ile Phe	Lys Asp	
	500		505			510	
AAA TTT CGT	GGA TGG G	TT GGA TTT	AGT GTT	CCA GTT	TCC CAC	CGA ATA	1582
Lys Phe Arg	Gly Trp V	al Gly Phe	Ser Val	Pro Val	Ser His	Arg Ile	
-	515	-	520		525		
ACT GCC GGC	TGC GAT A	TA TTG TTA	ATG CCA	TCC AGA	TTC GAA	CCT TGT	1630
Thr Ala Gly	Cys Asp I	le Leu Leu	Met Pro	Ser Arg	Phe Glu	Pro Cys	
530	1	535			540		
GGT CTC AAT	CAG CTA T	AT GCT ATG	CAG TAT	GGC ACA	GTT CCT	GTT GTC	1678
Gly Leu Asn	Gln Leu T	yr Ala Met	Gln Tyr	Gly Thr	Val Pro	Val Val	
545		550		555			
CAT GCA ACT	GGG GGC C	TT AGA GAT	ACC GTG	GAG AAC	TTC AAC	CCT TTC	1726
His Ala Thr	Gly Gly L	eu Arg Asp	Thr Val	Glu Asn	Phe Asn	Pro Phe	
560	_	65		570		575	
GGT GAG AAT	GGA GAG C	AG GGT ACA	GGG TGG	GCA TTC	GCA CCC	CTA ACC	1774
Gly Glu Asr	Gly Glu G	ln Gly Thr	Gly Trp	Ala Phe	Ala Pro	Leu Thr	
	580		585			590	
ACA GAA AAC							1822
Thr Glu Asr	Met Leu T	rp Thr Leu	Arg Thr	Ala Ile	Ser Thr	Tyr Arg	
	595		600		605		
	• •	•					
GAA CAC AAG							1870
Glu His Lys	s Ser Ser T	rp Glu Gly	Leu Met	Lys Arg	Gly Met	Ser Lys	
610)	615	i		620		
GAC TTC ACC	G TGG GAC C	AT GCC GCT	GAA CAA	TẠC GẠA	CAA ATC	TTC CAG	1918
Asp Phe Th	r Trp Asp H		Glu Gln		Gln Ile	Phe Gln	
625		630		635			
						1 amagmas	2070
TGG GCC TT					AGGACC AA	AGTGGTGG	1970
Trp Ala Pho			val Met			•	
640	6	345					
						NA A A A COCCE	2030
TTCCTTGAAG	ATCATCAGTT	CATCATCC	LA TAGTAA	GCTG AAT	GAIGAAA (BAAAACCCCT	2030
					a		2090
GTACATTACA	TGGAAGGCAC	ACCGGCTA:	rr GGCTCC	ATTG CTC	CAAIGIC	IGCITIGGCI	2050
·				12000 022	רכאראריי יי	アイマング かここか エ	2150
GCCTTGCCTC	GATGGACCG	ATGCAGTG	AG GAATCO	AGCC GAA	CGACAGI	LITOMAGGAI	2130
				10000 0ma	אייייריאיייא ל	TCGAACAAGC	2210
AGGAAGGGGA	GCTGGAAGC	A GTCACGCA	SG CAGCC	CGCC GTG	MITCHIA :	JUANUANUC	2210
			TO MMM* 04	ማመመከት መመመ	ተከተመተመሰር '	ኮር ፕሮፕፕሮፕ ^ተ ር	2270
TGGAGTCAGT	TTCTGCTGT	J CCACTCAC	IG TTTACC	LITAA GAT	IMIIMCC	1919119119	2210
macmme = ====		~	איזי פאפייפיי	מממ באלייתים	ልጥሮ ልጥ ሮር ፡	CTCGTTTTTA	2330
TCCTTTGCTC	GTTAGGGCT	J ATAACATA	MI GACICA	TITAG NAM	WICHIGO (

2383 TTAACTGAAG TGGACACTTC ATTCTTGC CCGTTTAAAA AAAAAAAAAA AAA

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 649 Aminosäuren

(B) ART: Aminosaure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Ala Arg Gly Leu Leu Ser Leu Ser Ala Met Ala Thr Pro Ser Ala Val

Gly Ala Ala Cys Leu Leu Leu Ala Arg Ala Ala Trp Pro Ala Ala Val 25

Gly Asp Arg Ala Arg Pro Arg Arg Leu Gln Arg Val Leu Arg Arg Arg 35 40

Cys Val Ala Glu Leu Ser Arg Glu Gly Pro Ala Pro Arg Pro Met Pro

Pro Ala Leu Leu Ala Pro Pro Leu Val Pro Gly Phe Leu Ala Pro Pro 70

Ala Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ala Leu Thr Pro Pro Pro Val Pro Asp 85

Ala Gly Leu Gly Val Leu Gly Val Glu Pro Glu Gly Ile Ala Glu Gly 105

Ser Ile Asp Asn Thr Val Val Val Ala Ser Glu Gln Asp Ser Glu Ile 120

Val Val Gly Lys Glu Gln Ala Arg Ala Lys Val Thr Gln Asn Ile Val 130 135

Phe Val Thr Gly Glu Ala Ser Pro Tyr Ala Lys Ser Gly Gly Leu Gly 145

Asp Val Cys Gly Ser Leu Pro Val Ala Leu Ala Ala Arg Gly His Arg 170 165

Val Met Val Val Met Pro Arg Tyr Leu Asn Gly Thr Ser Asp Lys Asn 180 185 190

Tyr Ala Asn Ala Phe Tyr Thr Glu Lys His Ile Arg Ile Pro Cys Phe

Gly Glu His Glu Val Thr Phe Phe His Glu Tyr Arg Asp Ser Val 220 215

44 Asp His Pro Ser Tyr His Arg H Gly Asn Leu Asp Trp Val Phe Y 230 235 Tyr Gly Asp Lys Phe Gly Ala Phe Gly Asp Asn Gln Phe Arg Tyr Thr Leu Cys Tyr Ala Ala Cys Glu Ala Pro Leu Val Leu Glu Leu Gly Gly Tyr Ile Tyr Gly Gln Asn Cys Met Phe Val Val Asn Asp Trp His Ala Ser Leu Val Pro Val Leu Leu Ala Ala Lys Tyr Arg Pro Tyr Gly 295 Val Tyr Lys Asp Ser Arg Ser Ile Leu Val Ile His Asn Leu Ala His 310 315 Gln Gly Val Glu Pro Ala Ser Thr Tyr Pro Asp Leu Gly Leu Pro Pro 325 Glu Trp Tyr Gly Ala Leu Glu Trp Val Phe Pro Glu Trp Ala Arg Arg 340 345 His Ala Leu Asp Lys Gly Glu Ala Val Asn Phe Leu Lys Gly Ala Val 360 Val Thr Ala Asp Arg Ile Val Thr Val Ser Lys Gly Tyr Ser Trp Glu 375 370 Val Thr Thr Ala Glu Gly Gly Gln Gly Leu Asn Glu Leu Leu Ser Ser 390 Arg Lys Ser Val Leu Asn Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Ile Asn Asp 405 Trp Asn Pro Ala Thr Asp Lys Cys Ile Pro Cys His Tyr Ser Val Asp 425 420 Asp Leu Ser Gly Lys Ala Lys Cys Lys Gly Ala Leu Gln Lys Glu Leu Gly Leu Pro Ile Arg Pro Asp Val Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg 455 460 Leu Asp Tyr Gln Lys Gly Ile Asp Leu Ile Gln Leu Ile Ile Pro Asp 475 465 470 Leu Met Arg Glu Asp Val Gln Phe Val Met Leu Gly Ser Gly Asp Pro Glu Leu Glu Asp Trp Met Arg Ser Thr Glu Ser Ile Phe Lys Asp Lys 510 505 Phe Arg Gly Trp Val Gly Phe Ser Val Pro Val Ser His Arg Ile Thr 520 515

2 · 1 · 2 · 1

Ala Gly Cys Asp Ile I Leu Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly 530 540

Leu Asn Gln Leu Tyr Ala Met Gln Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His 545 550 555 560

Ala Thr Gly Gly Leu Arg Asp Thr Val Glu Asn Phe Asn Pro Phe Gly 565 570 575

Glu Asn Gly Glu Gln Gly Thr Gly Trp Ala Phe Ala Pro Leu Thr Thr 580 585 590

Glu Asn Met Leu Trp Thr Leu Arg Thr Ala Ile Ser Thr Tyr Arg Glu
595 600 605

His Lys Ser Ser Trp Glu Gly Leu Met Lys Arg Gly Met Ser Lys Asp 610 620

Phe Thr Trp Asp His Ala Ala Glu Gln Tyr Glu Gln Ile Phe Gln Trp 625 630 635 640

Control of the Section 1

Ala Phe Ile Asp Arg Pro Tyr Val Met 645

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: JA
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Gly Thr Gly Gly Leu Arg Asp Thr Val Glu Asn Cys
1 5 10

46 Patentansprüche

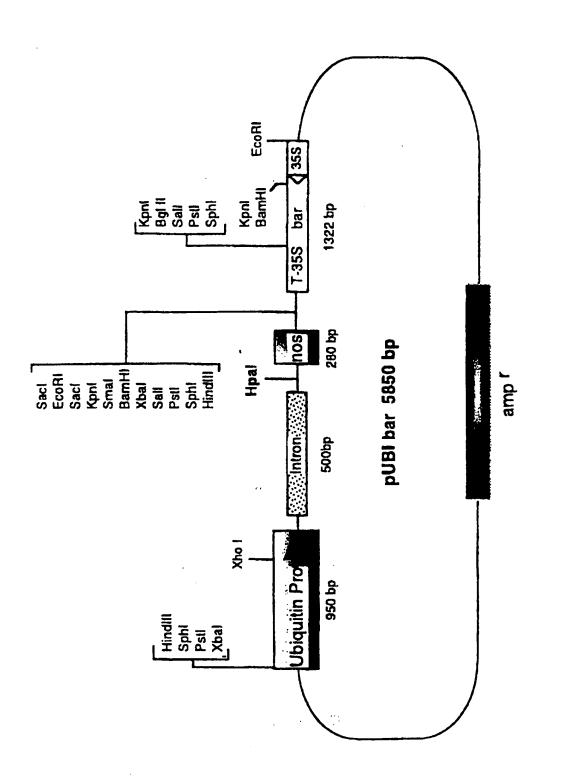
- Nucleinsäuremolekül, codierend ein Protein aus Mais mit der biologischen Aktivität einer Stärkesynthase des Typs I, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - (a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die unter Seq ID No. 2 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt;
 - (b) Nucleinsäuremolekülen, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz umfassen oder eine komplementäre Sequenz oder eine korrespondierende Ribonucleotidsequenz;
 - (c) Nucleinsäuremolekülen, deren einer Strang mit den unter (a) oder (b) genannten Nucleinsäuremolekülen hybridisiert; und
 - (d) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetisches Codes von der Sequenz der unter (a), (b) oder (c) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht.
- 2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein DNA-Molekül ist.
- 3. DNA-Molekül nach Anspruch 2, das ein cDNA-Molekül ist.
- 4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein RNA-Molekülist.
- 5. Oligonucleotid, das spezifisch mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 hybridisiert.
- Vektor, enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche
 bis 3.
- 7. Vektor nach Anspruch 6, wobei das DNA-Molekül in sense-Orientierung mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

8. Wirtszelle, mit einem Nucleinsäurer lekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einem Vektor nach Anspruch 6 oder 7 genetisch modifiziert ist.

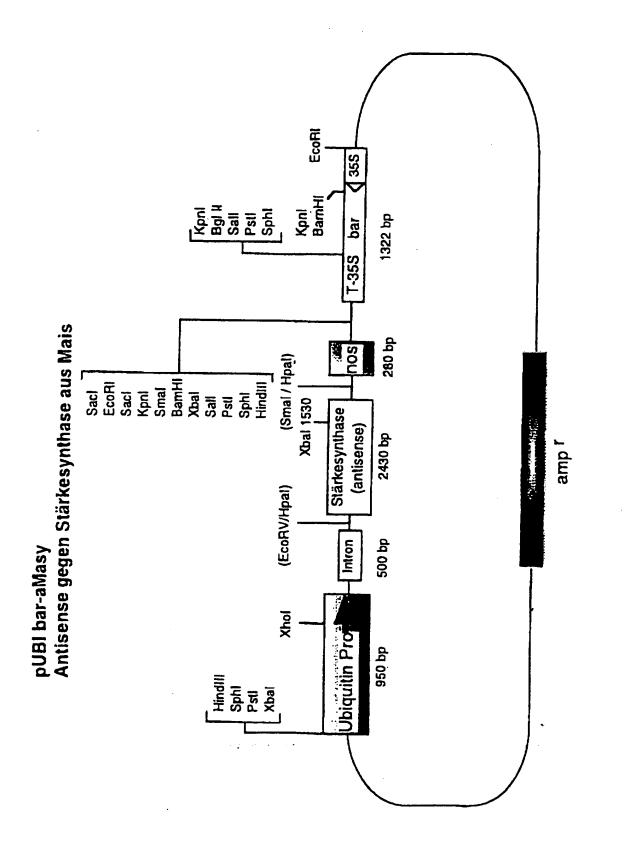
- 9. Protein codiert durch ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
- 10. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach Anspruch 9 oder eines biologisch aktiven Fragmentes davon, bei dem eine Wirtszelle nach Anspruch 8 unter Bedingungen kultiviert wird, die die Synthese des Proteins erlauben, und das Protein aus den kultivierten Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.
- 11. Transgene Pflanzenzelle, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einem Vektor nach Anspruch 6 oder 7 modifiziert ist, wobei das Nucleinsäuremolekül, das das Protein mit der biologischen Aktivität einer Stärkesynthase codiert, unter der Kontrolle regulatorischer Elemente steht, die die Transkription einer translatierbaren mRNA in pflanzlichen Zellen erlauben.
- 12. Pflanze, enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 11.
- 13. Pflanze nach Anspruch 12, die eine Nutzpflanze ist.
- 14. Pflanze nach Anspruch 13, die eine stärkespeichernde Pflanze ist.
- 15. Pflanze nach Anspruch 14, die eine Maispflanze ist.
- 16. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem der Ansprüche 12 bis 15, enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 11.
- 17. Transgene Maispflanzenzelle, die im Vergleich zu den nichttransformierten Zellen eine Verringerung der Aktivität eines Proteins nach Anspruch 9 aufweist und die stabil in ihr Genom integriert ein rekombinantes Molekül aufweist bestehend aus

(a) eine n pflanzlichen Zellen ak en Promotor; und

- (b) einer Nucleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - (i) Nucleinsäuresequenzen, die eine antisense-RNA zu einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 codieren;
 - (ii) Nucleinsäuresequenzen, die ein Ribozym codieren, das spezifisch RNA-Moleküle nach Anspruch 4 spaltet; und
 - (iii) Nucleinsäuresequenzen, die eine sense-RNA für ein Protein nach Anspruch 9 codieren, deren Expression zu einem Cosuppressionseffekt führt.
- 18. Maispflanze, enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 17.
- 19. Vermehrungsmaterial einer Maispflanze nach Anspruch 18, enthaltend Zellen nach Anspruch 17.



Figur 1



Figur 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten and Application No PCT/EP 97/02527

A. CLASSIFI IPC 6	CATION OF SUBJECT MATTER C12N15/82 C12N 0 C12N1	5/54 A01H5/00	
According to	International Patent Classification (IPC) or to both national class	sification and IPC	
B. FIELDS S	EARCHED		
Minimum doo IPC 6	umentation searched (classification system followed by classifi ${\tt C12N}$	ication symbols)	
Documentatio	on searched other than minimum documentation to the extent th	at such documents are included in the fields sea	urched
Electronic da	ta base consulted during the international search (name of dat	a base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUME	NTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	e relevant passages	Relevant to claim No.
х	C. MU ET AL.,: "Association polypeptide with soluble stard activity in maize (cv B73) end THE PLANT JOURNAL, vol. 6, no. 2, 1994, pages 151-159, XP000651922 cited in the application see the whole document	:h synthase I	1-10
X	C. HARN ET AL.: "Isolation of synthase cDNA clone from maize W64A" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 108, no. 2, 1995, page 50 XP000651998 abstract no. 187 see abstract		1-10
X Furt	her documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed	is annex.
"A" docume consider if ing consider which citation "O" docume other "P" do	ant defining the general state of the art which is not dered to be of particular relevance document but published on or after the international date international date into the published on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another in or other special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means ent published prior to the international filing date but han the priority date claimed	"T" later document published after the interest or priority date and not in conflict with cited to understand the principle or the invention "X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot involve an inventive step when the description of particular relevance; the cannot be considered to involve an inventive step when the description of particular relevance; the cannot be considered to involve an inventive sombined with one or ments, such combination being obvious in the art. "&" document member of the same patents."	the application but secony underlying the claimed invention of the considered to cournent its taken alone claimed invention inventive step when the core other such docupous to a person skilled
Date of the	actual completion of the international search	Date of mailing of the international sec	arch report
1	5 October 1997	3 1 10.97	
Name and	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijawijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Mateo Rosell, A.	м.

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern 1al Application No
PCT/EP 97/02527

	Relevant to claim No
Change of Cooding It, Will Brondaid I, Wilers appropriate, of the Followin Passages	
DATABASE WPI Week 9416 15 March 1994 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 94128678 XP002043588 & JP 06 070 779 A (MITSUI GYOSAI SHOKUBUTSU BIO KENKYUSHO), 15 March 1995	1-14
T. BABA ET AL.,: "Identification, cDNA cloning, and gene expression of soluble starch synthase in rice (Oryza sativa L.) immature seeds" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 103, 1993, pages 565-573, XP000565731 cited in the application see the whole document, in particular Figure 5	1-10
WO 94 09144 A (ZENECA LTD) 28 April 1994 see page 5, line 8 - page 12, line 21 see example 4 see claims 1-17,19-33	1-19
DE 44 41 408 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 15 May 1996 see the whole document	1-19
DE 43 30 960 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 16 March 1995 see the whole document	11-19
WO 97 20936 A (ZENECA LTD) 12 June 1997 see SEQ.ID.N.1 see the whole document	1-19
	Week 9416 15 March 1994 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 94128678 XP002043588 & JP 06 070 779 A (MITSUI GYOSAI SHOKUBUTSU BIO KENKYUSHO), 15 March 1995 see abstract T. BABA ET AL.,: "Identification, cDNA cloning, and gene expression of soluble starch synthase in rice (Oryza sativa L.) immature seeds" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 103, 1993, pages 565-573, XP000565731 cited in the application see the whole document, in particular Figure 5 WO 94 09144 A (ZENECA LTD) 28 April 1994 see page 5, line 8 - page 12, line 21 see example 4 see claims 1-17,19-33 DE 44 41 408 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 15 May 1996 see the whole document DE 43 30 960 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 16 March 1995 see the whole document WO 97 20936 A (ZENECA LTD) 12 June 1997 see SEQ.ID.N.1

MILEMINETONIES OFFICE --

Information on patent family members

PCT/EP 97/02527

Patent document cited in search report	ublication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9409144 A	28-04-94	AU 2696492 A EP 0664835 A	09-05-94 02-08-95
DE 4441408 A	15-05-96	AU 3927995 A WO 9615248 A EP 0791066 A	06-06-96 23-05-96 27-08-97
DE 4330960 A	16-03-95	AU 7657394 A CA 2171313 A WO 9507355 A EP 0719338 A HU 74667 A JP 9502098 T	27-03-95 16-03-95 16-03-95 03-07-96 28-01-97 04-03-97
WO 9720936 A	12-06-97	AU 1037197 A	27-06-97

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nterna ales Aktenzeichen PCT/EP 97/02527

KLASSIFIZIERUNG DES ANMEHENNGSGEGENSTANDES C12N15/54 A01H IPK 6 12N9/10 C12N15/82 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprufstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12N Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank, und evtl. verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr, Anspruch Nr. Kategorie* C. MU ET AL., : "Association of a 76 kDa 1-10 Χ polypeptide with soluble starch synthase I activity in maize (cv B73) endosperm" THE PLANT JOURNAL, Bd. 6, Nr. 2, 1994, Seiten 151-159, XP000651922 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument 1-10 C. HARN ET AL.: "Isolation of a starch Х synthase cDNA clone from maize inbred line W64A" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 108, Nr. 2, 1995, Seite 50 XP000651998 abstract no. 187 siehe Zusammenfassung -/--Siehe Anhang Patentfamilie Χ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen "A" Veröffenttichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips ader der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf *L.* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsenspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet ausgeführt) werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist Absendedatum des internationalen Recherchenberichts Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 3 1, 10, 97 15.0ktober 1997 Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Bevollmächtigter Bediensteter Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijawijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nt, Mateo Rosell, A.M. Fax: (+31-70) 340-3016

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. hales Aktenzeichen PCT/EP 97/02527

X X	DATABASE WPI Week 9416 15.März 1994 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 94128678 XP002043588 & JP 06 070 779 A (MITSUI GYOSAI SHOKUBUTSU BIO KENKYUSHO), 15.März 1995 siehe Zusammenfassung T. BABA ET AL.,: "Identification, cDNA cloning, and gene expression of soluble starch synthase in rice (Oryza sativa L.) immature seeds" PLANT PHYSIOLOGY,	nden Teile	1-14 1-10
(DATABASE WPI Week 9416 15.März 1994 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 94128678 XP002043588 & JP 06 070 779 A (MITSUI GYOSAI SHOKUBUTSU BIO KENKYUSHO), 15.März 1995 siehe Zusammenfassung T. BABA ET AL.,: "Identification, cDNA cloning, and gene expression of soluble starch synthase in rice (Oryza sativa L.) immature seeds"		
	Week 9416 15.März 1994 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 94128678 XP002043588 & JP 06 070 779 A (MITSUI GYOSAI SHOKUBUTSU BIO KENKYUSHO), 15.März 1995 siehe Zusammenfassung T. BABA ET AL.,: "Identification, cDNA cloning, and gene expression of soluble starch synthase in rice (Oryza sativa L.) immature seeds"		
x	cloning, and gene expression of soluble starch synthase in rice (Oryza sativa L.) immature seeds"		1-10
	Bd. 103, 1993, Seiten 565-573, XP000565731 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument, insbesondere Figure 5		
x	WO 94 09144 A (ZENECA LTD) 28.April 1994 siehe Seite 5, Zeile 8 - Seite 12, Zeile 21 siehe Beispiel 4 siehe Ansprüche 1-17,19-33		1-19
A	DE 44 41 408 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 15.Mai 1996 siehe das ganze Dokument		1-19
A	DE 43 30 960 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 16.März 1995 siehe das ganze Dokument		11-19
E	WO 97 20936 A (ZENECA LTD) 12.Juni 1997 siehe SEQ.ID.N.1 siehe das ganze Dokument		1-19

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP 97/02527

lm Recherchenbericht Ingeführtes Patentdokum	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(e Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9409144 A	28-04-94	AU 2696492 A EP 0664835 A	09-05-94 02-08-95
DE 4441408 A	15-05-96	AU 3927995 A WO 9615248 A EP 0791066 A	06-06-96 23-05-96 27-08-97
DE 4330960 A	16-03-95	AU 7657394 A CA 2171313 A WO 9507355 A EP 0719338 A HU 74667 A JP 9502098 T	27-03-95 16-03-95 16-03-95 03-07-96 28-01-97 04-03-97
WO 9720936 A	12-06-97	AU 1037197 A	27-06-97